

研究報 文

食品中の酸化防止剤に関する研究

3,5-di-tert.-butyl 4-hydroxy-toluene の定量法について

安井 市治* 霊山 満佐子**

Studies on the Antioxidant in the Foods.

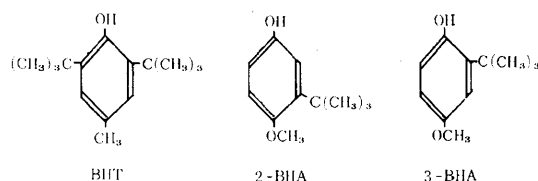
On the determination of 3,5-di-tert.-butyl 4-hydroxy-toluene.

Ichiji Yasui Masako Yoshiyama

I 緒 言

一般に食品が酸化する原因は酸素, 酵素, 日光, 熱, その他β線やγ線のような放射線のもとに起こるものであり, 酸化には種々の型があると考えられる。いずれの原因にしても食品の酸化は好ましくない現象であり, 食品の色, 味, 香り, 栄養価などの点でいじりしく食品を劣化させるものである。その意味で食品の酸化を防止することは食品の品質の保持, 流通のための保存, その他多様化した現代の食生活にみあう食品という観点からも必要不可欠なことであろう。酸化防止剤のみならずこれら食品添加物が人体にとって無害であることは, 添加物本来の目的と相俟って必須の条件である。食品添加物公害が社会問題として云々されている昨今, 使用される添加物の種類および添加量にするとい視線をあてる必要があると考えるものである。

3,5-di-tert.-butyl 4-hydroxy-toluene (BHT) は酸化防止剤として数種の食品に一定量の添加が許可されている物質であり, 元来, 石油製品やゴム製品の合成酸化防止剤として開発されたものである。同じような目的で開発された酸化防止剤に BHA (3-tert.-butyl 4-hydroxy-anisol または 2-tert.-butyl-4-hydroxy-anisol および二者の混合物) がある。BHT は BHA とのシナジスト効果が高いため実際には BHA と併用されているのが現状である。



毒性の点で問題となる BHT のフェノール性は, オルト位にあるかさの高い第三ブチル基や, パラ位のメチル基の存在でかなり弱められているものと考えられる。また熱に対する安定性がたかく, 加熱加工しても効力の低下の少ないこと, 安価であることなどの理由により消費量はかなり大きく, 現在添加を許されている食品と添加量は次のとおりである。

表1 BHTの使用規準

魚介冷凍品および鯨冷凍品の浸漬液	1 kg につき
	1g 以下
油脂, バター, 魚介乾製品, 魚	…1kgにつき0.2g以下
介塩蔵品, 乾燥うらごしいも	
チューインガム	1 kg につき 0.75 g 以下

なお毒性については W. B. Deichman¹⁾ および J. J. Clemmer, I. K. Karplyuk, Brown, 青木, J. C. Dacre,²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾らの研究がみられるが定見はないようであり, 一般には急性毒性はマウスに経口投与した場合 LD 50 は 1.39 g/kg, 慢性毒性については本品 0.2~1% 配合飼料でラットを 105 日間飼育した結果変化を認めていない。FAO/WHO は BHT の許容一日摂取量を 0~0.5 mg/kg としている。トコフェロール (ビタミンE)

*本学食品衛生学研究室 **本学栄養指導研究室

やセサモール（ゴマ油中に存在する）などの天然酸化防止剤は使用規準はない（合成品である dL- α トコフェロールは酸化防止以外の目的に使用してはならない）が過量を用いるとかえって酸化を促進したり有害であったりする。現在、酸化防止剤としてはほとんど市場を独占している BHT, BHA については過剰添加による効果の減少は知られていないが、正しい使用法および品質管理という観点から食品中の酸化防止剤の把握が必要とされるわけである。BHT の分離、定性、定量については種々の研究がなされているが決定的な方法はないといつてよい。一般的には有機溶媒による抽出、水蒸気蒸留法による分離、紫外、可視、赤外等光学的方法、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィーによる定量などが行なわれている。そこでこれらの分析法を参考としながら簡便な分析法について検討を行なったので報告する。

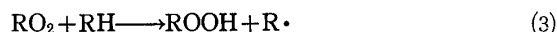
1. II BHT の酸化防止機構について

自動酸化反応は通常つぎのような素反応にわけられる。

自動酸化連鎖の開始



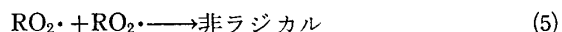
連鎖の進行



連鎖の分枝



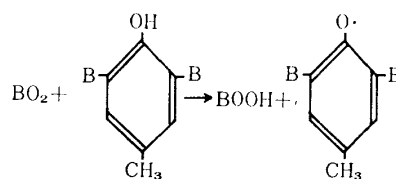
連鎖の停止



すなわち開始段階ではラジカルまたはパーオキシラジカルが生成する。つぎの(3')の段階では生成したパーオキシラジカルが末反応の不飽和脂質 RH にはたらいて水素をひきぬき、みずからはヒドロパーオキシドとなるとともに新しいフリーラジカルを作る。この $R\cdot$ は(2)に示されるようにさらに O_2 と結びついてパーオキシラジカルを生成するゆえ、この反応は連鎖反応となる。酸化防止剤は水素ひきぬきの段階で連鎖を切断する役目を果すものである。すなわち連鎖反応における $RO_2\cdot$ に水素または電子を与え比較的安定な中間体とすることである。もし抗酸化分子 AH が水素供与体としてはたらくならば

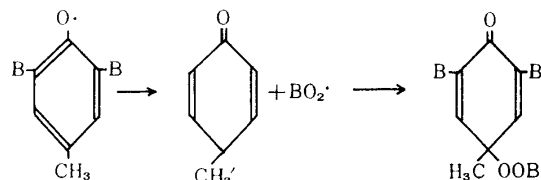
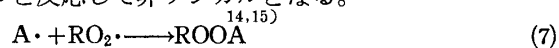


となりこれを実際に BHT のはたらきとして考えると第三ブチル基を B であらわすとき、



の如く反応すると考えられ $A\cdot$ は共鳴によって安定化されているので、連鎖移動により新しいラジカルを生成することはむづかしい。特に BHT のごとく OH 基がかさばった置換基によって保護されているときにこの傾向は大きい。

(6)に示す反応により生じた $A\cdot$ はもう一つのラジカルと反応して非ラジカルとなる。



通常、フェノール系酸化防止剤 1 モルは 200~300 モルのパーオキシドの生成を妨げると云われている。

II 実験および結果

II. I. 油脂および水溶液中の BHT の分離と TLC による定量

大豆油に 200mg/kg の割合で BHT を添加しこれを検体とする。検体 50 g を蒸留フラスコに採り、飽和塩化マグネシウム溶液 30ml を加えて 160~170°C の油浴に浸し 8~10ml/min の速度で水蒸気蒸留を行ない留液 500ml を得る。これを分液ロートにとり四塩化炭素各 5 ml, 3 ml, 2 ml で三回抽出し、留出液を合わせて正確に 10ml となるようさらに四塩化炭素を加えて検液とする。薄層プレート（メルクのシリカゲル 0.25 mm の吸着層を作り 130°C, 1hr 加熱活性化したもの）の下端より 2 cm のところに検液 10 μ l を添付し、つぎの六種の展開溶媒を用いてそれぞれ原点から 10cm の距離まで室温で展開した。

展開条件決定のため用いた溶媒

①ベンゼン

②クロロホルム

③四塩化炭素

④n-ヘキサン

⑤n-ヘキサン：四塩化炭素（3：1）

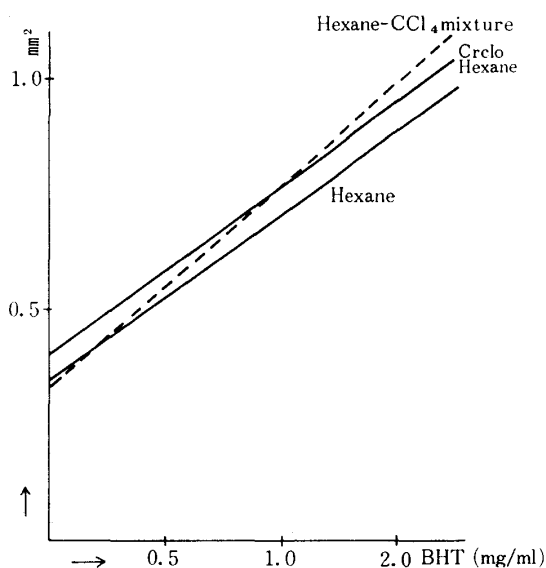
⑥シクロヘキサン

表 2 各展開溶媒による BHT の Rf 値とスポットの形状

溶 媒	ベンゼン	クロロホルム	四塩化炭素	ヘキサン	ヘキサン：クロロホルム(3:1)	シクロヘキサン
Rf 値	0.91	0.99	0.86	0.38	0.55	0.44
形 状	扁 平	扁 平	楕 円	円形(小)	やや扁平な楕円	ほぼ完全な円形

展開終了後、リンモリブデン酸溶液（リンモリブデン酸の 20% アルコール溶液）を噴霧し約 80℃ の乾燥器中で 10 分間加熱する。発色した青紫色のスポットをノギスを用いて 0.01 mm まで正確に測り、円型または楕円形の面積を算出する。スポットの面積と BHT 濃度は比例関係にあるので検量線の作成を行なった。また展開溶媒の種類によるスポットの形状（まとまりの良さ）の判定も同時に行ない、溶媒の適否を決定した。

検量線作成については、四塩化炭素 1ml 中に BHT 各 0.25mg, 0.5mg, 1.0mg, 1.5mg, 2.0mg を溶かしこの 10 μ l をとり前記条件で薄層クロマトグラフィーを行なった。溶媒は上記の六種をそれぞれ用い結果は表 2, 図 4 に示すごとくである。



各展開溶媒については表 2 のとおりであるが、ベンゼンでは横に長く扁平なスポットを見、面積の算出は困難である。クロロホルムは六種の溶媒中もっとも悪く、溶媒の上端にそって横にひろがりスポットの形状をなさない。四塩化炭素では扁平な楕円形でノギスによる測定可能、ヘキサンでは良好なスポットながら小さくまとまってしまう、ノギスでの測定に誤差をもたらす率の大きいと考えられる。ヘキサン：クロロホルムではやや扁平ながら良好にまとまっている。シクロヘキサンはほぼ完全な円形でよくまとまり良好なスポットが得られた。

この結果よりつぎに水溶液から分離した BHT について検討を行なった。BHT を定量的に溶かしたエタノールの一定量を水 500 ml に加える。白濁した BHT 水溶液を四塩化炭素各 5ml, 3ml, 2ml で三回抽出し抽出液を合して、さらに四塩化炭素を加え正確に 10ml とする。これを検液として前記大豆油と同条件で TLC を行なった。

表 3. 各展開溶媒による BHT の Rf 値とスポットの形状

溶 媒	四塩化炭素	ヘキサン	ヘキサン：クロロホルム(3:1)	シクロヘキサン
Rf 値	0.80	0.34	0.42	0.39
形 状	扁 平	楕 円	楕 円	ほぼ完全な円形

Ⅱ. Ⅱ 油脂および水溶液中の BHT の UV による定量
10mg の BHT を添加した大豆油 50g を蒸留フラスコに採り、飽和塩化マグネシウム液 30ml を加えて 160~170℃ の油浴に浸し 8~10 ml/min の速度で水蒸気蒸留を行ない留液 500 ml を得る。これを分液ロートに移し四塩化炭素各 5 ml, 3 ml, 2 ml で三回抽出、抽出液を合してさらに四塩化炭素で正確に 10ml としこれを検液④とする。

エタノール 10 ml に BHT 10 mg を溶かした液を水 500 ml によく混和し白濁した水溶液を分液ロートに移す。四塩化炭素を用いて前記油脂と同様の抽出を行ない、ここに得た四塩化炭素 10ml を検液⑤とする。検液④, ⑤について、いずれも 1ml 中に 50 μ g の BHT を含むよう四塩化炭素でさらに希釈し 278m μ における吸光度を測定した。回収率は表 4 に示すとおりであり、これを展開溶媒シクロヘキサンによる TLC の回収率と比較してみた。

表 4. 油脂および水溶液から分離した BHT の回収率

④ 大豆油から分離		⑤ 水溶液から分離	
TLCによる	UVによる	TLCによる	UVによる
97.1%	92.5%	96.8%	98.0%

この結果より上記分離法による回収はかなり効率よ

く行なわれると思われる。なお油脂の水蒸気蒸留については留液が 500 ml を超えても回収率は向上しなかった。上記分離法を市販食品の BHT 定量に用いるについて天野, 川田, 川城らによれば, BHT 以外の酸化防止剤の影響について没食子酸エステル類は水蒸気蒸留で留出せず, また他のフェノール, クレゾールは留出しても薄層プレートに展開することにより影響はまったくなくなると述べている。

Ⅱ. Ⅲ 乾燥食品中の BHT の分離定量

Ⅱ. Ⅲ. 1 検体の作成

馬鈴薯の可食部をスライスし水洗してあくぬきを行ない, さらにエーテルで脱脂したのち煮沸する。これにエタノールに溶かした BHT をふりかけてよく混和し, 70°C で通風乾燥, 粉末としてこれを検体とする。なお BHT 添加量は乾燥粉末製品としたとき 1 kg に対して 200mg となるように加える。

Ⅱ. Ⅲ. 2 溶媒による抽出と TLC による定量

検体 10g をとり乳鉢でさらによく細碎し, これにヘキサン, エタノール, エーテル, 四塩化炭素をそれぞれ加えて 1 hr 攪拌抽出を行ない濾過する。抽出液はそれぞれ減圧濃縮し正確に 10ml とする。その 10 μ l をとって TLC を行なった。条件は前記同様, 溶媒シクロヘキサンによる。結果, 各抽出溶媒別による回収率と R_f 値を表 5 に示す。

表 5. 各抽出溶媒による回収率

	ヘキサン	エタノール	エーテル	四塩化炭素
R _f 値	0.43	0.48	0.95	0.86
回収率(%)	61.4	88.0	79.3	100.4

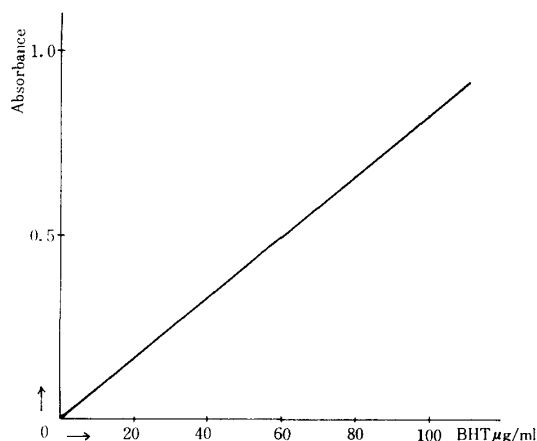
前処理段階で脱脂の操作が不完全であると脂肪の妨害により展開は行なわれず原点に止まったままか, あるいは長いテーリングを見るのみであった。したがって市販ポテトフレークについて直接溶媒抽出法による BHT の分離および TLC による定量は不適当である。

Ⅱ. Ⅲ. 3 水蒸気蒸留による分離と可視部吸光度による定量

蒸気発生器に純水 1500ml を入れる。検体 0.5g をさらに細碎して蒸留フラスコに入れ, イソプロパノール 50ml, 水 200ml, 消泡剤一滴を加えて検体とよくふりまぜる。BHT の呈色反応を妨害するほかのフェノール性物質や酸性化合物を除くため, 2%酸化マグネシウムサスペンション 500ml を受器との中間のトラップに入れ蒸留フラスコに連結する。市販食品の場合とくに漂白した食品は亜硫酸塩を含んでいると考

えられ発色を妨害するのでこの操作は必要である。すべての継ぎ目をたしかめてから予熱した水蒸気を通じる。約 15min で 100ml の留液を得る。留液 50ml を 100ml の分液ロトに採り, ジアニシジン溶液 (3,3'-ジメトキシベンシジン 0.5g と活性炭 0.5g をイソプロパノール 100ml 中でよく振りまぜてから濾過し, 濾液 40ml を 100ml フラスコに採り 1N 塩酸で 100ml とする。この液は用時調製する。) 100ml および 0.2%亜硝酸ナトリウム溶液 (用時調製) 5ml を加えてふりまぜる。正確に 10min 後にクロホルム 20ml を加え約 30sec ふりまぜ, 1min 放置後クロホルム層を 50ml 容フラスコに移し無水硫酸ナトリウム 7~8g で脱水し直ちに 520m μ における吸光度をよみとる。対照液はイソプロパノール 50ml を用い試料と同様に処理したものを用いる。

つぎに 50% イソプロパノール 1ml 中に 10 μ g の BHT を含む液の 2, 4, 6, 8, 10ml をそれぞれ 50ml 容のフラスコに採り, さらに 50% イソプロパノールを加えて 50ml とする。これを前記試料と同様の発色と抽出を行なったのち 520m μ の吸光度を読みとり検量線を作成する。



BHT の ppm は次式により計算する。

$$\text{BHT (ppm)} = \frac{F \times \text{試料吸光度}}{(50/100) \text{ 試料 } g}$$

ただし F=BHT μ g/標準溶液の吸光度

この方法によれば検体からの BHT 回収率は平均 94.1%であった。

Ⅱ. Ⅳ 市販食品中の BHT の定量

Ⅱ. Ⅳ. 1 市販ポテトフレークをさらに細碎し

Ⅲ. 3 の水蒸気蒸留法にしたがい BHT の分離と発色の操作を行なったのち 520m μ における吸光度を測定する。前記計算式にしたがえば市販ポテトフレーク中の BHT は 79mg/kg であった。

Ⅱ. IV. 2 市販ポテトフレーク 50g を蒸留フラスコにとり水 200 ml および飽和塩化マグネシウム 30 ml を加えよくふりまぜる。これを沸騰しない程度の水浴に浸し蒸気発生器から蒸気をおくって 8~10 ml/min の速さで留液 500ml を得る。留液を分液ロトに移し四塩化炭素各 5ml, 3ml, 2ml で三回抽出し抽出液を合してさらに四塩化炭素を加えて正確に 10ml とする。この液の 10 μ l を用いて展開溶媒シクロヘキサンによる前記条件の TLC を行なった。結果三個のスポットを得、それぞれ 2-BHA, 3-BHA, BHT のスポットと合致した。BHT の含量は前記検量線によれば 76mg/kg であった。

表 6. 市販ポテトフレークの TLC

	BHT	2-BHA	3-BHA
サンプル(Rf 値)	0.52	0.28	0.45
対 照(Rf 値)	0.52	0.28	0.44

市販ポテトフレーク中の BHT 含量は上記二方法ともほぼ合致し許可量の半分以下である。

Ⅱ. V 市販油脂中の BHT の定量

Ⅱ. V. 1 バター, 食用油の TLC による BHT の定量

市販バター 50g を石油エーテル 100ml に溶かす。これを分液ロトに移し 72%エタノール 100ml を加えてよく振る。エタノール層を採り乾燥濾紙で濾過したのち 40°C 減圧下で 5 ml まで濃縮する。これを酢酸エチル各 50ml で二回抽出し抽出液を合して無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。濾過したのち再び 40°C 減圧下で 5 ml 以下となるまで濃縮しベンゼンを加えて正確に 5ml とする。この液 10 μ l をとり TLC を行なった。展開プレートは前記シリカゲル薄層, 溶媒シクロヘキサン, 発色剤 20% リンモリブデン酸アルコール溶液, 室温で原点から 10cm 展開を行なった。市販バター A, B の二種について定量を行なったが, BHT の含量は前記検量線によればサンプル A で 92mg/kg, サンプル B では 38mg/kg であった。

表 7. 市販バターの TLC

	BHT	2-BHA	3-BHT
サンプル A Rf 値	0.53	0.23	0.47
サンプル B Rf 値	0.53	0.21	0.45
対 照	0.53	0.20	0.45

市販天ぷら油およびサラダ油についても、それぞれ 50 g をとり 72% エタノールと共に分液ロト中でよく振る。以下上記バターと同様に抽出濃縮の操作を行ない検液を得る。この検液 10 μ l についてバター同様 TLC を行なったが天ぷら油, サラダ油ともにそれぞれ二個のスポットを得、2-BHA, 3-BHA に対応した。BHT は含有されていないものと思われる。

Ⅱ. V. 2 バターの可視部吸光度による BHT の定量

バター 50g を石油エーテルに溶かしたのち乾燥濾紙で濾過する。これを蒸留フラスコに移しイソプロパノール 50ml, 水 200ml, 消泡剤一滴を加えて検体とよく混和する。20% 酸化マグネシウムサスペンション 50ml を入れたトラップを受器との間に連結し水蒸気を通じ、約 15min で 100ml の留液を得る。留液の 50ml を 100ml の分液ロトに採り、ジアニシジン溶液 (前記) 10ml および 0.2% 亜硝酸ナトリウム液 (前記) 5ml を加えてふりまぜ正確に 10min 後にクロロホルム 20 ml を加えて再びふりまぜて 1 min 放置する。のち、クロロホルム層を 50ml 容フラスコに移し無水硫酸ナトリウム 7~8 g で乾燥、直ちに 520m μ における吸光度を読みとる。その結果前記計算式によれば、BHT の含量はサンプル A で 89 mg/kg, サンプル B 40mg/kg であり許可量の 1/2 ないし 1/2 以下であった。また、この結果はⅡ. V. 1 の TLC による結果とほぼ合致する。

Ⅲ 要 約

1. 大豆油および水溶液中の BHT を水蒸気蒸留法, 溶媒抽出法で分離し TLC による定量を行なうとき, スポットの面積と BHT 濃度は比例関係にあり, したがってスポットの形状がよく面積の算出が容易である展開溶媒はベンゼン, クロロホルム, 四塩化炭素, ヘキサン, ヘキサン: 四塩化炭素 (3:1), シクロヘキサンの六種のうちシクロヘキサンが最も良好であった。
2. 大豆油および水溶液中の BHT を分離し, TLC により定量したところ回収率は約 97% UV による定量では平均 95% の回収率をみた。
3. 馬鈴薯に BHT を添加, 乾燥粉末とした製品から四塩化炭素で抽出, TLC により定量したところ回収率は 100% であった。また, 同検体より水蒸気蒸留で BHT を分離し, 520m μ の吸光度による定量では回収率は 94% であった。
4. 市販食品中 (バター, ポテトフレーク等) の BHT

の定量の結果は TLC, UV, 可視部吸光度ともにはば一致する。

なお, IR, NMR による検索に到らなかったことを残念に思う。

この研究は昭和四十六年度, 文理科学研究所 研究助成金の交付を受けて行ない得たものである。また, この研究の指導と助成金交付について御助力いただいた布浦弘教授にも記して謝意を表したい。

参 考 文 献

- 1) W. B. Deichmann, J. J. Clemmer : *Arch. Ind. Health*, **11**, 2(1955).
- 2) I. A. Karplyuk: *Voprosy Pitaniya*, **18** 24(1959).
C. A. **54**, 14479(1960).
- 3) Brown Johnson, O' Halloran : *Aust. J. Exp. Biol.*, **37**, 533 (1959).
- 4) 青木勇 : 食衛誌, **3**, 123(1962); M. Akagi, I. Aoki : *Chem. & Parm. Bull.*, **10**, 101(1962).
- 5) J. C. Dacre : *Biochem. J.*, **78**, 758(1961).
- 6) C. Anglin, J. H. Mahon : *Agr. Food Chem.*, **4**, 1018(1956); M. A. Phillips : *Agr. Food Chem.*, **5**, 379(1957).
- 7) L. C. Mitchell : *J. A. O. A. C.*, **40**, 909 (1957);
“(日本薬学会編)衛生試験法注解” 209 (1957).
- 8) C. B. Roberts, J. D. Swank : *Anal. Chem.*, **36**, 271 (1964).
- 9) 竹下隆三, 坂上米次, 伊藤望 : 衛生化学, **15**, 77 (1969).
- 10) V. J. Filipic, C. L. Ogg : *J. Assoc. Offic Agr. Chem.*, **43**, 795 (1960).
- 11) C. R. Szalkowski, J. B. Garber : *J. Agr. Food Chem.*, **10**, 490(1962).
- 12) K. B. Berger, N. D. Sylvester : *Analyst*, **85**, 341 (1960).
- 13) J. L. Bolland, P. T. Haave : *Trans. Faraday Soc.*, **43**, 201 (1947).
- 14) A. F. Bickel, E. C. Kooyman : *J. Chem. Soc.*, **1953**, 3211
- 15) T. W. Campbell, G. M. Coppinger : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1469 (1952).
- 16) S. J. Purdy, E. V. Truter : *Chem. and Ind.*, **1962**, 506(1962).
- 17) 天野立爾, 川田公平, 川城巖 : 食衛誌, **15**, 333 (1964).